

AD

METHOD FOR MEASURING NUMBER OF MICROORGANISMS, IMAGE ANALYZE FOR MEASURING MICROORGANISM AND INCUBATOR

Patent number: JP9159612

Publication date: 1997-06-20

Inventor: MURAKAMI TAKASHI

Applicant: KONISHIROKU PHOTO IND

Classification:

- international: G01N21/84; G06M11/00; G01N21/84; G06M11/00;
(IPC1-7): G01N21/84; G06M11/00

- european:

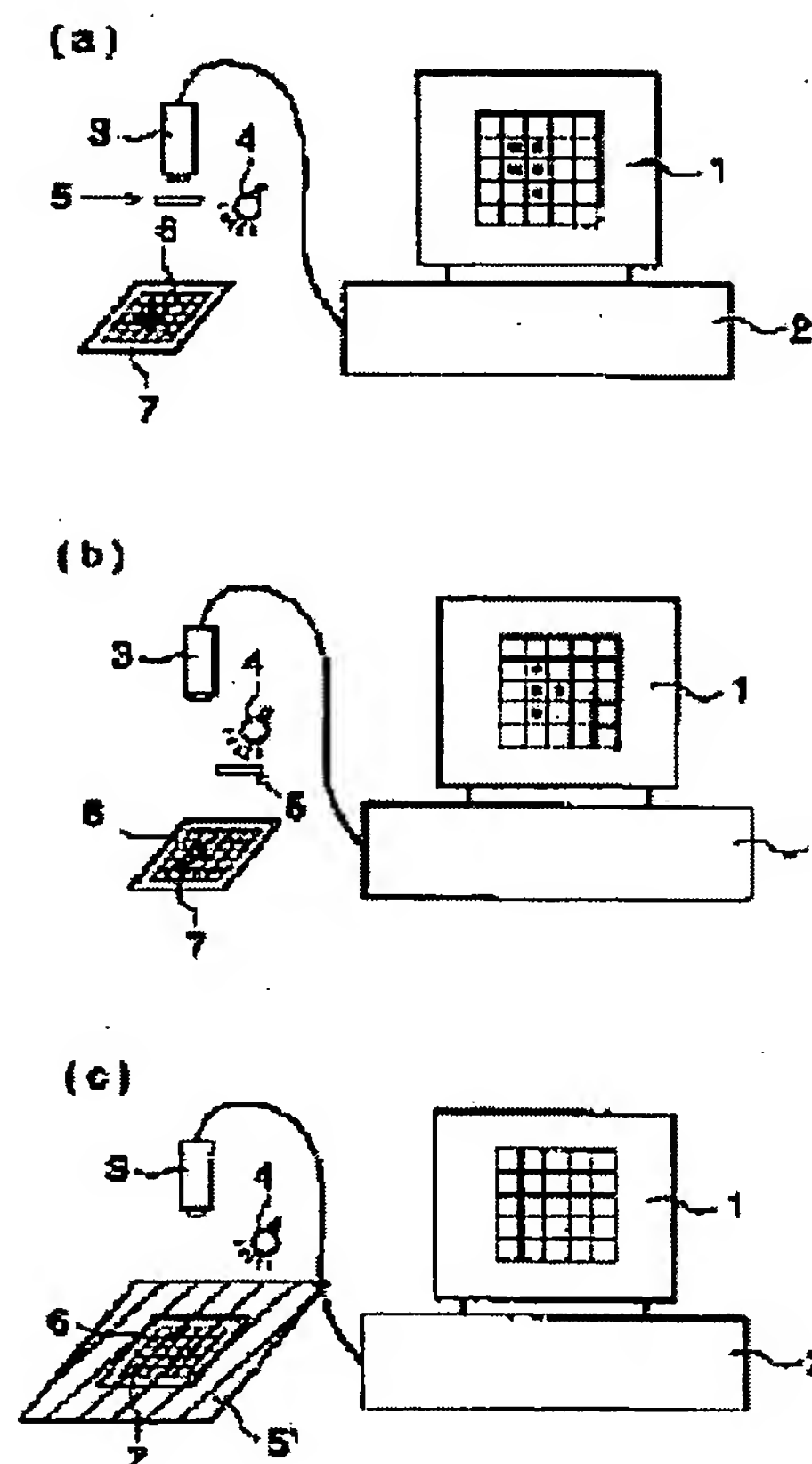
Application number: JP19950318090 19951206

Priority number(s): JP19950318090 19951206

Report a data error here

Abstract of JP9159612

PROBLEM TO BE SOLVED: To determine the colony count accurately even during image analysis by inserting a colored filter between a carrier having a grid for visually measuring the color and an image input unit. **SOLUTION:** When determining the colony count based on image information, a color filter 5 corresponding to the color of grid 6 for visually measuring the color provided for a carrier mounting a medium 7 is fixed to the image information input section (TV camera or CCD camera) 3. At the time of determining the colony count on the medium 7, a filter 5 is provided between an illumination light source 4 and the medium 7 or a large filter 5' is provided for the medium thus illuminating the medium 7 with a light passed through the filters 5, 5'. An analyzer (automatic colony counter) 2 is provided with the image information of medium 7 being picked up through the filter 5 and/or 5 and since the grid 6 causes no noise in an image analysis, the colony count can be determined accurately.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-159612

(43)公開日 平成9年(1997)6月20日

(51)Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 21/84			G 0 1 N 21/84	Z
G 0 6 M 11/00			G 0 6 M 11/00	A
				D

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平7-318090

(22)出願日 平成7年(1995)12月6日

(71)出願人 000001270

コニカ株式会社

東京都新宿区西新宿1丁目26番2号

(72)発明者 村上 隆

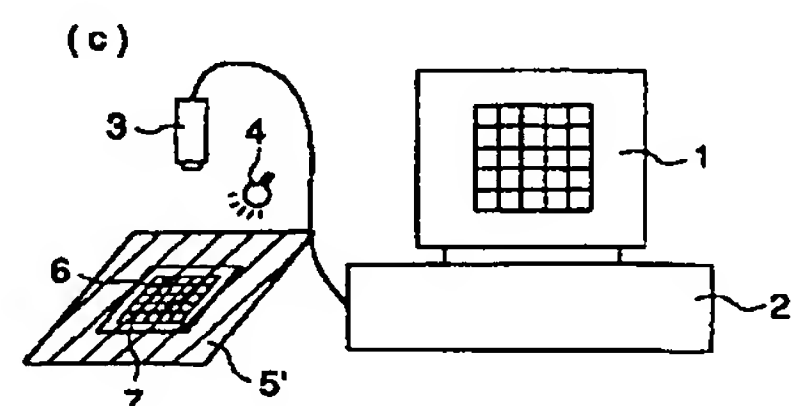
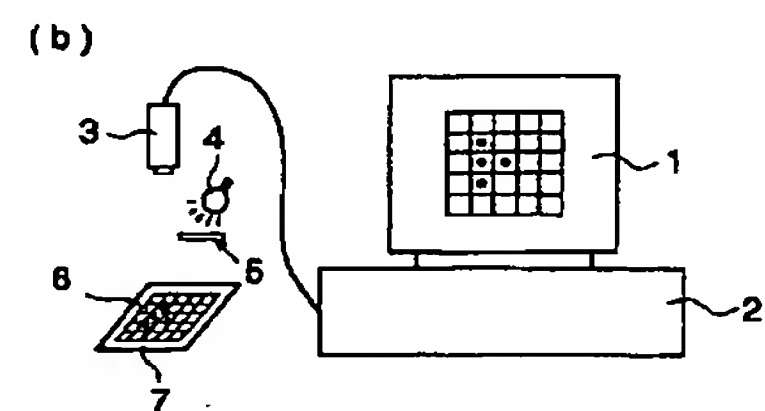
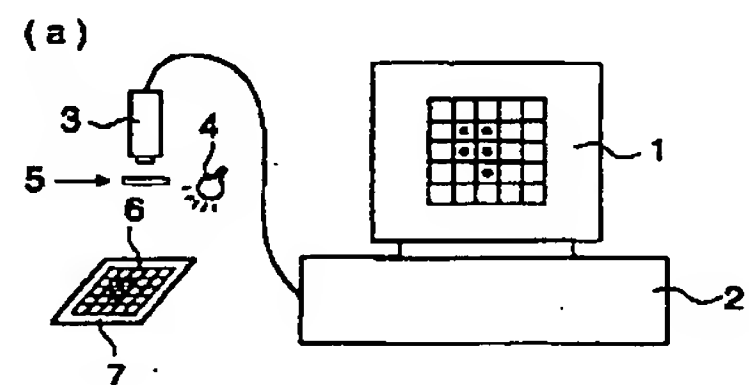
東京都日野市さくら町1番地コニカ株式会社内

(54)【発明の名称】 微生物数の測定方法、微生物数の測定用画像解析装置及び培養具

(57)【要約】

【課題】 目視計測用グリッド（格子）があっても、正確なコロニーカウントの出来る微生物数の測定方法、微生物数の測定用画像解析装置及び培養具の提供。

【解決手段】 微生物数の測定方法において、有彩色のグリッドを有する担体上の培地で成育した微生物集落数を画像解析装置により計測する際に、前記担体と画像入力装置との間に有彩色のフィルターを設置したことを特徴とする微生物数の測定方法、微生物数の測定用画像解析装置及び培養具。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物数の測定方法において、有彩色のグリッドを有する担体上の培地で育成した微生物集落数を画像解析装置により計測する際に、前記担体と画像入力装置との間に有彩色のフィルターを設置したことを特徴とする微生物数の測定方法。

【請求項2】 微生物数の測定方法において、有彩色のグリッドを有する担体上の培地で育成した微生物集落数

$60 \leq L^*$ 、かつ $-60 \leq a^* \leq 60$ 、 $5 < b^*$ 、

さらに $0 < a^*$ のとき $a^* \leq b^*$ 又は $a^* < 0$ のとき $-a^* \leq b^*$

で規定される色を有し、前記有彩色のフィルターを白色紙に密着させて測色した

場合、

$50 \leq L^*$ 、かつ $-60 \leq a^* \leq 60$ 、 $60 < b^*$ 、

さらに $0 < a^*$ のとき $a^* \leq b^*$ 又は $a^* < 0$ のとき $-a^* \leq b^*$

である条件を満たす有彩色のフィルターであることを特徴とする請求項1又は2記載の微生物数の測定方法。

【請求項4】 有彩色のグリッドを有する担体上で育成した微生物集落数を画像解析装置により計測する際に使用する微生物数の測定用画像解析装置において、前記培地と画像入力装置との間に有彩色のフィルターを設置したことを特徴とする微生物数の測定用画像解析装置。

【請求項5】 有彩色のグリッドを有する担体上で育成した微生物集落数を画像解析装置により計測する際に使用する微生物数の測定用画像解析装置において、前記培地と照明用光源の間に有彩色のフィルターを設け、該フィルターを通過した光によって照明されている培地の画像情報を画像入力装置に入力するようにした微生物数の測定用画像解析装置。

【請求項6】 有彩色のグリッドを有する担体上に培地を設け、さらにその観察側に着脱可能な有彩色のフィルター設けた培養具。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、液体試料中の生菌数測定に関し、さらに詳しくは、培地上で育成した微生物集落数を測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、液体試料中の生菌数測定のために、培地上で育成した微生物集落数を測定する方法が行なわれている。このとき、例えば培地中に指示薬（テトラゾリウム塩など）を添加しておき、菌の育成に応じて色素を形成させることによって視認性を向上させ、コロニーの検出を容易にする方法などが行なわれてきた。又、目視によるコロニーのカウントを行いやすいように培地をのせている担体、あるいはメンブランフィルターにおけるフィルターなどにグリッド（格子）を設けるという工夫もなされていた。

【0003】目視計測用のグリッドは目で見てコロニーをカウントする場合は非常に便利なものである。コロニ

を画像解析装置により計測する際に、前記担体と照明用光源の間に有彩色のフィルターを設け、該フィルターを通過した光によって照明されている培地の画像情報を画像入力装置に入力することを特徴とする微生物数の測定方法。

【請求項3】 前記有彩色のグリッドが、測色計にて【外1】

一数が数十程度であればそれほど時間を要せずにカウントできる。画像解析装置（自動コロニーカウンター）によってカウントするのと比較しても装置の準備などの時間を考えればかえって目視によるカウントの方が簡便かつ迅速である場合も多い。しかしながらコロニー数が100以上に多くなると目視によるカウントでは時間がかかりすぎてしまうため、画像解析装置（自動コロニーカウンター）による測定の方が簡便で迅速な測定が可能である。ところが、グリッドを有する担体上のコロニーを画像解析装置（自動コロニーカウンター）によってカウントする場合、該グリッドが画像信号の上でノイズとなり、正確なコロニー数のカウントが困難であった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は目視によるコロニーカウントでも、画像解析装置によるコロニーカウントでも正確な測定結果が得られる微生物測定方法及び測定装置、培養具を提供することを目的としている。すなわち、目視計測用グリッドがあるとこれが画像解析の際にノイズとなってしまい、正確なコロニーカウントが困難であるという問題を解決することを目的としている。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明の上記目的は、下記構成によって達成される。

【0006】（1） 微生物数の測定方法において、有彩色のグリッドを有する担体上の培地で育成した微生物集落数を画像解析装置により計測する際に、前記担体と画像入力装置との間に有彩色のフィルターを設置したことを特徴とする微生物数の測定方法。

【0007】（2） 微生物数の測定方法において、有彩色のグリッドを有する担体上の培地で育成した微生物集落数を画像解析装置により計測する際に、前記担体と照明用光源の間に有彩色のフィルターを設け、該フィルターを通過した光によって照明されている培地の画像情報を画像入力装置に入力することを特徴とする微生物数

の測定方法。

【0008】(3) 前記有彩色のグリッドが、測色計にて

$60 \leq L^*$ 、かつ $-60 \leq a^* \leq 60$ 、 $5 < b^*$ 、

さらに $0 < a^*$ のとき $a^* \leq b^*$ 又は $a^* < 0$ のとき $-a^* \leq b^*$

で規定される色を有し、前記有彩色のフィルターを白色紙に密着させて測色した場合、

$50 \leq L^*$ 、かつ $-60 \leq a^* \leq 60$ 、 $60 < b^*$ 、

さらに $0 < a^*$ のとき $a^* \leq b^*$ 又は $a^* < 0$ のとき $-a^* \leq b^*$

【0010】である条件を満たす有彩色のフィルターであることを特徴とする前記1又は2記載の微生物数の測定方法。

【0011】(4) 有彩色のグリッドを有する担体上で成育した微生物集落数を画像解析装置により計測する際に使用する微生物数の測定用画像解析装置において、前記培地と画像入力装置との間に有彩色のフィルターを設置したことを特徴とする微生物数の測定用画像解析装置。

【0012】(5) 有彩色のグリッドを有する担体上で成育した微生物集落数を画像解析装置により計測する際に使用する微生物数の測定用画像解析装置において、前記培地と照明用光源の間に有彩色のフィルターを設け、該フィルターを通過した光によって照明されている培地の画像情報を画像入力装置に入力するようにした微生物数の測定用画像解析装置。

【0013】(6) 有彩色のグリッドを有する担体上に培地を設け、さらにその観察側に着脱可能な有彩色のフィルター設けた培養具。

【0014】グリッド(格子)が入ったメンブランフィルターやフィルム状の担体上で成育した微生物の集落数を計測する場合、通常前記グリッドを利用して目視でカウントが行なわれていた。集落数が少ない場合は目視でカウントする方が、簡便で装置の準備なども含めると

$60 \leq L^*$ 、かつ $-60 \leq a^* \leq 60$ 、 $5 < b^*$ 、

さらに $0 < a^*$ のとき $a^* \leq b^*$ 又は $a^* < 0$ のとき $-a^* \leq b^*$

(視野角 2° 、光源 D65) である条件を満たす色であることが好ましい。

さらに好ましくは、 $75 \leq L^* \leq 95$ 、かつ $-30 \leq a^* \leq 30$ 、 $10 < b^*$ 、

さらに $0 < a^*$ のとき $a^* \times 2 \leq b^*$ 又は $a^* < 0$ のとき $-a^* \times 2 \leq b^*$

であることが望ましい。

【0017】通常培地をのせる紙あるいは樹脂製シートなどの担体に油性インキを用いて印刷されたものが用いられる。あるいは低濃度(数十個/ml以下)の細菌数を測定する際に利用されているメンブランフィルター法におけるメンブランフィルターに有彩色のグリッドが設けられる。

【0018】本発明に用いられるフィルターはグリッドの色に応じて選択される。すなわち、フィルターを白色の紙の上に重ねて密着させた際に観察される色がグリッ

【0009】

【外2】

かえて短時間にカウント可能である。一方、集落数が多くなると目視によるカウントでは時間を要し、多量処理には不適當であった。そのため、コロニー数が多い場合は画像解析装置を利用した自動コロニーカウンターを用いることが望ましい。ところが、目視計測用グリッド(格子)があるとこれが画像解析の際にノイズとなってしまう、正確なコロニーカウントが困難であるという問題があった。そこでこの問題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、グリッド(格子)が入ったメンブランフィルターやフィルム状の担体上で成育した微生物の集落数を画像解析によってカウントする場合に、前記グリッド(格子)部と画像入力部の間に有彩色のフィルターを設けるか、あるいは、前記有彩色のフィルターを通した照明の下で当該培地を観察することによってグリッドによるノイズを著しく低減させ、これによって極めて正確な測定を行なうことが可能となった。

【0015】本発明のグリッドの色は、有彩色であれば特に限定はされないが、特に下記の条件を満たすものが好ましい。すなわち、測色計(例えば GRETAG SPM100-II DATA AND IMAGE SYSTEMS)で測定して CIELAB Color Space によって定義した場合、

【0016】

【外3】

ドの色相に近いことが望ましく、特に黄色系の色が望ましい。具体的には白色の紙の上に重ねて密着させたフィルターを測色計(例えば GRETAG SPM100-II DATA AND IMAGE SYSTEMS)で測定して CIELAB Color Space によって定義した場合、

【0019】

【外4】

$50 \leq L^*$ 、かつ $-60 \leq a^* \leq 60$ 、 $60 < b^*$ 、

さらに $0 < a^*$ のとき $a^* \leq b^*$ 又は $a^* < 0$ のとき $-a^* \leq b^*$

(視野角 2° 、光源 D65) である条件を満たすフィルターであることが好ましい。

さらに好ましくは、 $60 \leq L^* \leq 90$ 、かつ $-35 \leq a^* \leq 35$ 、 $70 < b^*$ 、

さらに $0 < a^*$ のとき $a^* \times 2 \leq b^*$ 又は $a^* < 0$ のとき $-a^* \times 2 \leq b^*$

であることが望ましい。

【0020】フィルターの材質は、ガラス、各種プラスチックシート、フィルム、あるいはセロファン膜等特に限定はない。

【0021】本発明の画像解析装置は、模式的に図1に示すが、コロニー数をカウントするためのビデオカメラ又はCCDカメラなどからなる画像情報入力部(3)と、その情報を演算してコロニー数を求める解析装置(2)及びモニター(1)から構成される。本発明の有彩色のフィルター(5)はビデオカメラ又はCCDカメラなどの画像情報入力部に取付ける(図1(a))ことができる。あるいは担体上のコロニーをカウントする場合は上部からあてる照明用光源(4)と培地(7)の間に有彩色のフィルターを設け、該有彩色のフィルターを通過した光によって照明されているように設置する(図1(b))ことができる。更に、図1(c)に示すように、培地と同等かやや大きめの有彩色のフィルター(5')を設けてもよい。

【0022】本発明の微生物数測定方法は様々な培地で利用可能である。例えば、図3に示すように、シャーレ(22)等で作成した普通寒天培地、標準寒天培地、や他の種々の培地(25)が利用できる。この場合シャー

$80 \leq L^*$ 、かつ $-5 \leq a^* \leq 5$ 、 $-5 \leq b^* \leq 5$

(視野角 2° 、光源 D65) となるものが用いられるが、コロニーの判別を容易

にするため着色されている担体を利用することも可能である。

又、培地に添加する指示薬としては、染色されたコロニーの色が、

$L^* \leq 50$ 、 $20 \leq a^*$ かつ $b^* < a^*$

(視野角 2° 、光源 D65) となるものが特に好ましく利用される。

【0025】又、このような培養具に有彩色のメンブランフィルターを着脱可能な状態でセットしたもの(図2)も用いられる。例えば、紙又はプラスチックシート(15)の上面に、有彩色のグリッド(13)を有し、その上に乾燥した培地(14)が塗設される。透明フィルム(12)を、紙又はプラスチックシート(15)の端に接着し、培地を保護できるようにする。培地と略等しい大きさ又はそれより大きな有彩色のフィルター(11)を準備し、紙又はプラスチックシートの端(16)で接着してもよく、別に用意しておいてもよい。目視によるカウントの際は該フィルター(11)を使用せずにカウントし、画像解析装置を利用する際は培地の観測側に該フィルター(11)を重ねて測定を行うことで簡便

レの底面にグリッドを印刷した紙又はプラスチックシートをはりつけるか、その上にのせて観察することができる。あるいは、メンブランフィルター法に使用するメンブランフィルター(21)に有彩色のグリッドを設けたものも利用できる。さらには、グリッドを印刷した紙又はプラスチックシート上に寒天などの培地を塗布乾燥させた簡易培地も好ましく利用することができる。特に培地に指示薬(トリフェニルテトラゾリウムクロライドなどを添加することによってコロニー(23)が適当な色に染色されるようにした培地が好ましく用いられ、例えばペトリフィルムAC(スリーエム製)等が市販されている。本発明はこのようなグリッドを有する培養具(培地+容器及び/又は担体)を用いた微生物の測定に利用できる。尚、測定は図3(b)の(24)で示す矢印の方向から行う。

【0023】グリッドを設ける担体は白色であることが望ましく、例えば測色計(例えばGRETAG SPM 100-II DATA AND IMAGE SYSTEMS)で測定した場合、

【0024】

【外5】

でかつ正確な測定を行うことが可能になる。

【0026】

【実施例】

培地の調製

黄色の油性インクで1cmきざみの方眼を印刷した白色の紙を作成した。この紙の上に印刷されたインクを測色計(GRETAG SPM100-II DATA AND IMAGE SYSTEMS)で測定した結果、

【0027】

【外6】

$L^* = 88.9$ 、 $a^* = -0.7$ 、 $b^* = 38.9$

【0028】(視野角 2° 、D65光源)であった。この紙はオートクレーブにて滅菌した。

【0029】標準寒天培地（栄研化学製）1リットルを調製し、オートクレーブにて滅菌した。クリーンベンチ内で冷却し、45℃に維持した。これに過滅菌したトリフェニルテトラゾリウムクロライド（TTC）溶液5mg/mlを10ml添加混合した。この普通寒天培地を前記方眼を描いた紙上に約1mmの膜厚で塗布し、乾燥させた。

【0030】試料の準備

イオン交換水から分離した一般細菌を純水中に懸濁して25～250個/mlの濃度の試料水-1～-3を調製した。

【0031】培養

マイクロピペットにて試料水-1～-3を各々1mlずつ前記の培地に滴下し、ポリエチレン製透明フィルムを密着させて該被検水を培地上で約20cm²に広げて、培地を膨潤させた（n=2で実施）。このままこれを35℃にて2日間培養した。2日後、培地上に出現した赤色の斑点の数を目視及び自動コロニーカウンター（Colony Analyzer Systems CA-7II システムサイエンス社製）を使用し、上部反射照明にてカウントし比較例とした。さらに本発明の測定方法-1（図1（a））として、カメラレンズに黄色のフィルターをセットして測定を行った。さらに、本発明の測定方法-2（図1（b））として、照明用光源部に黄

色のフィルターをセットして測定を行った。さらに、本発明の測定方法-3（図1（c））として、前記培地に黄色のフィルターを重ねて軽く密着させて測定を行った。使用したフィルターは白色の紙の上に重ねて密着させて測色計（GRETAG SPM100-II DATA AND IMAGE SYSTEMS）にて測定したところ、

【0032】

【外7】

$$L^*=82.3, a^*=3.6, b^*=114.2$$

【0033】であった。出現コロニー数が数十程度であれば短時間でカウントできた。一方、コロニー数が百を越えると1分～数分を要し、時間がかかった。自動コロニーカウンターによる測定は測定装置の事前の準備を除けば、短時間でカウント可能であったが、比較の方法-2では目視計測用の方眼（グリッド）がノイズとなり、実際のコロニー数よりも多い値を示してしまい、正確な測定はできなかった。これに対し、フィルターを用いた本発明の方法では方眼（グリッド）による影響は認められず、目視によるカウントと同じ結果が得られた。結果は表1に示す。

【0034】

【表1】

	測定方法	n=2 測定	測定カウントされたコロニー数 (個/ml)		
			試料-1	試料-2	試料-3
比較の方法-1	目視によるカウント	1	26	121	240
		2	27	123	235
比較の方法-2	自動コロニーカウンターによるカウント	1	56	152	268
		2	65	168	282
本発明の方法-1	自動コロニーカウンター（画像入力部に有彩色のフィルター設置）によるカウント	1	26	121	240
		2	27	123	235
本発明の方法-2	自動コロニーカウンター（照明用光源部に有彩色のフィルター設置）によるカウント	1	26	121	240
		2	27	123	235
本発明の方法-3	自動コロニーカウンター（有彩色のフィルターを培地に密着）によるカウント	1	26	121	240
		2	27	123	235

【0035】従って、本発明の方法によれば目視計測用のグリッドを有する培地上に出現したコロニー数を目視測定と同等の正確さでかつコロニー数が多い場合でも短時間にカウント可能であった。又、コロニー数が数十程度であれば目視計測用のグリッドを用いて簡便かつ正確にカウント可能であった。

【0036】

【発明の効果】本発明により、目視計測用グリッド（格子）があっても、正確なコロニーカウントの出来る微生物

数の測定方法、微生物数の測定用画像解析装置及び培養具が得られた。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の微生物数の測定用画像解析装置を示す図である。

【図2】メンブランフィルター法を示す図である。

【図3】本発明の培養具を示す図である。

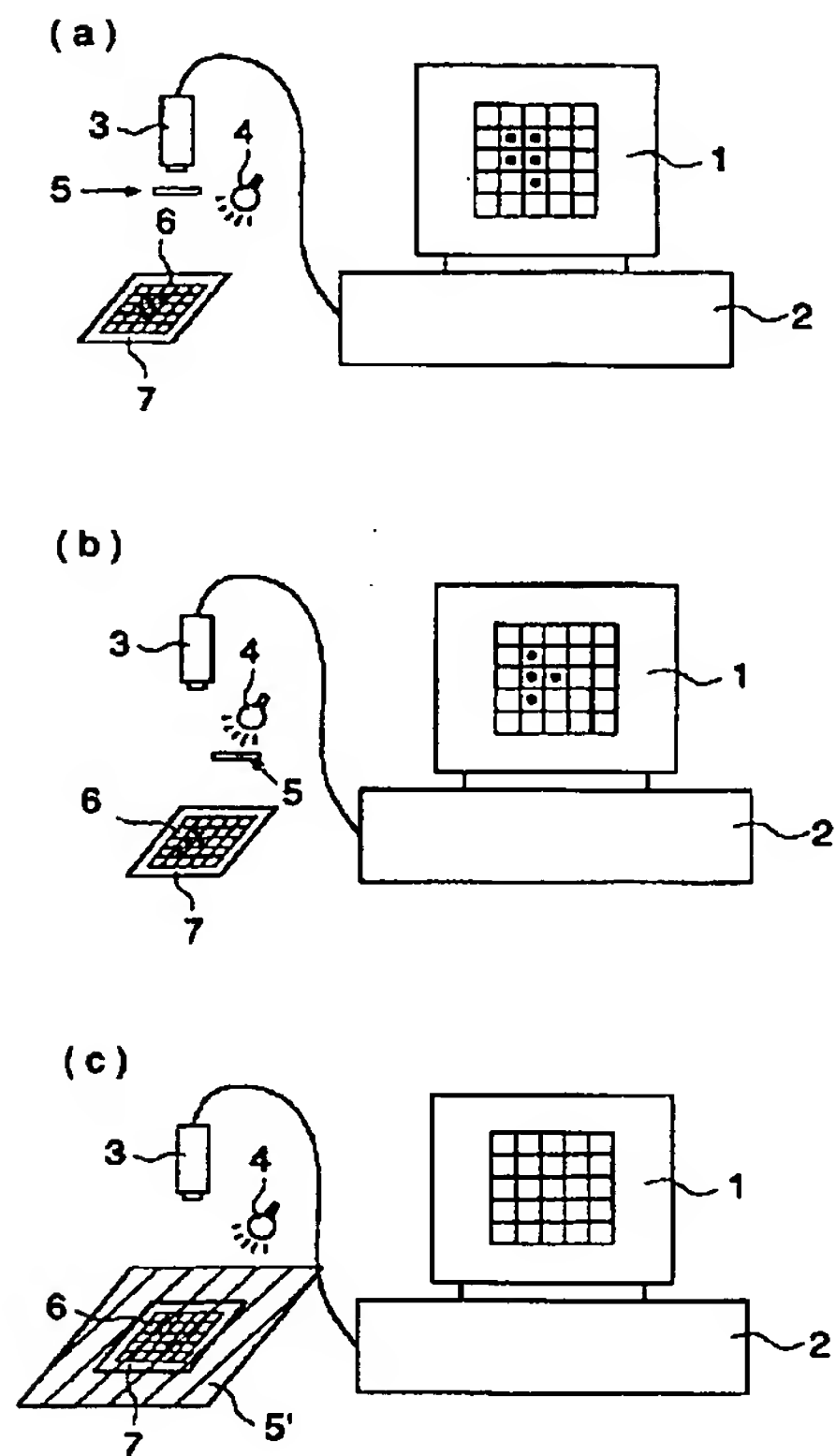
【符号の説明】

1 モニター

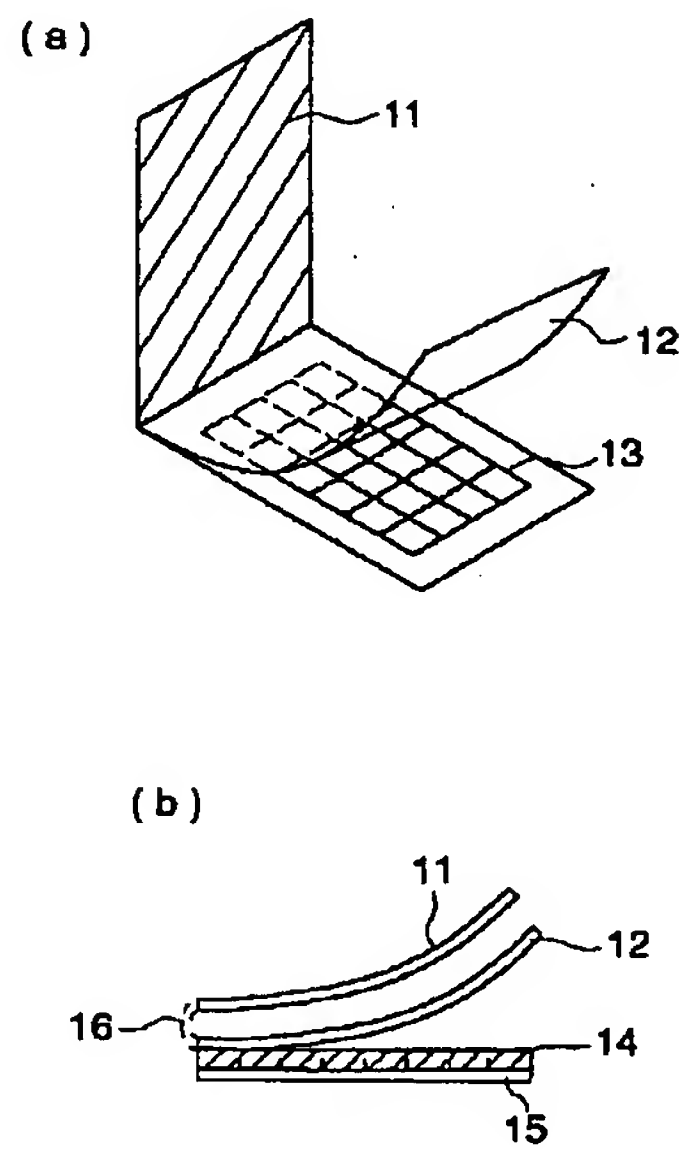
- 2 コロニー数を求める解析装置
- 3 画像情報入力部
- 4 照明用光源
- 5 有彩色のフィルター
- 5' 培地と同等かやや大きめの有彩色のフィルター
- 6 有彩色のグリッド
- 7 培地
- 11 培地と略等しい大きさ又はそれより大きな有彩色のフィルター
- 12 透明フィルム

- 13 有彩色のグリッド
- 14 培地
- 15 紙又はプラスチックシート(担体)
- 16 紙又はプラスチックシートの端
- 21 有彩色のグリッドを持つメンブランフィルター
- 22 シャーレ
- 23 コロニー
- 24 測定方向
- 25 培地

【図1】



【図2】



【図3】

